



Μικροβιολογία Τροφίμων I

Εργαστήριο

Ενότητα 7:

Κλασσικές & Σύγχρονες (Ταχείες)
Μέθοδοι Μέτρησης Μικροβιακού
Φορτίου (1/3), 2ΔΩ

Τμήμα: Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής Του Ανθρώπου

Διδάσκοντες: Ευστάθιος Ζ. Πανάγου

Πασχαλίτσα Τρυφινόπουλου

Αναστάσιος Σταματίου



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ





Μαθησιακοί Στόχοι

- Η εξοικείωση των φοιτητών με τις ταχείες μεθόδους απαρίθμησης του μικροβιακού φορτίου στα τρόφιμα.



Λέξεις Κλειδιά

- Ταχείες μέθοδοι απαρίθμησης μικροβιακού φορτίου
- Μέθοδος δεκαδικών αραιώσεων
- Μέθοδος οπτικής πυκνότητας
- Μέθοδος ηλεκτρικής αγωγιμότητας
- Αιματοκυτόμετρο
- Μέθοδος περισσότερο πιθανού αριθμού
- Σπειροειδής μέθοδος απαρίθμησης



A. Κλασσικές Μέθοδοι 1/2

- Μέθοδος τρυβλίων (standard plate count)
- Διαδοχικές αραιώσεις
- (Ringer solution, Buffered Peptone Water, Maximum Recovery Diluent)
- Επιλεκτικά υποστρώματα
- (XLD, Palcam, Oxford, CFC, Rose Bengal Chloramphenicol agar, Violet Red Bile Glucose agar)
- Επιφανειακή εξάπλωση (spread plating)
- Ενσωμάτωση (pour plating)



A. Κλασσικές Μέθοδοι 2/2

Πλεονεκτήματα:

- Απλότητα
- Προσαρμοστικότητα
- Ευκολία στην εφαρμογή

Μειονεκτήματα:

- Η ικανότητα απαρίθμησης μόνο των κυττάρων εκείνων που σχηματίζουν βιώσιμες αποικίες
- Απαιτήσεις σε χρόνο, υλικά και εργασία
- Η μη ικανοποιητική ακρίβεια της μεθόδου που επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως η ορθή εκτέλεση της τεχνικής και η φύση του δείγματος



Τεχνική Δεκαδικών Αραιώσεων

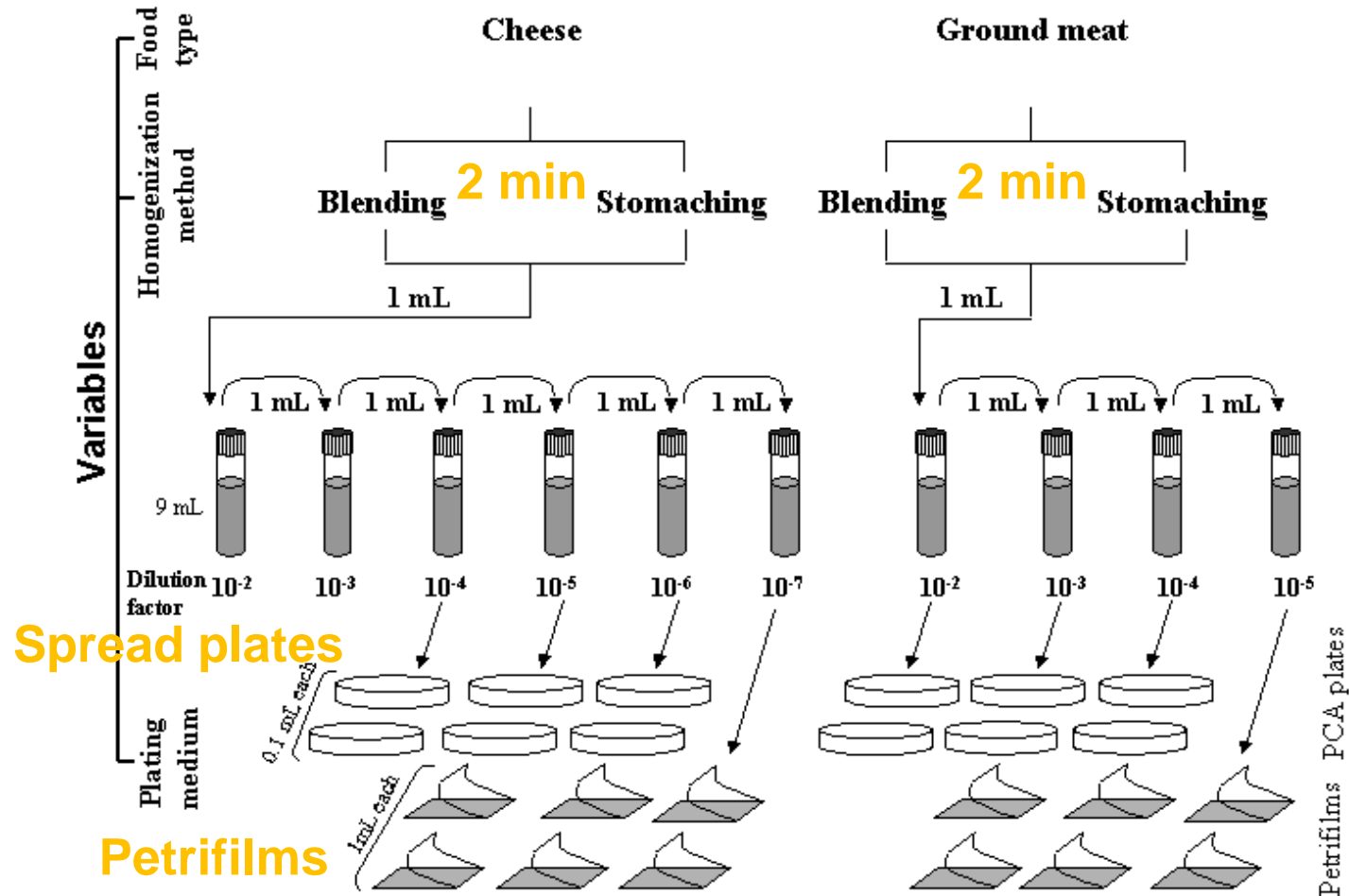


Fig. 2.2. Overall procedure used in the total plate count exercise



Η τεχνική της Σταγόνας (Drop plate) (Μέθοδος Miles and Misra) 1/2

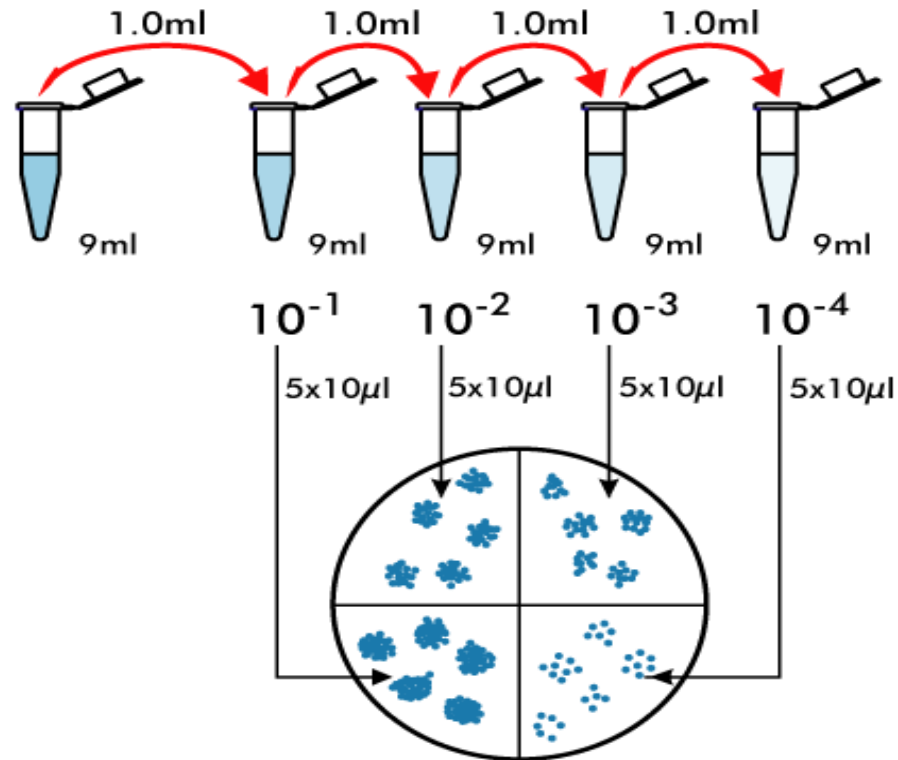


Figure 1. Dilution series followed by drop-plating techniques



Η τεχνική της Σταγόνας (Drop plate) (Μέθοδος Miles and Misra) 2/2



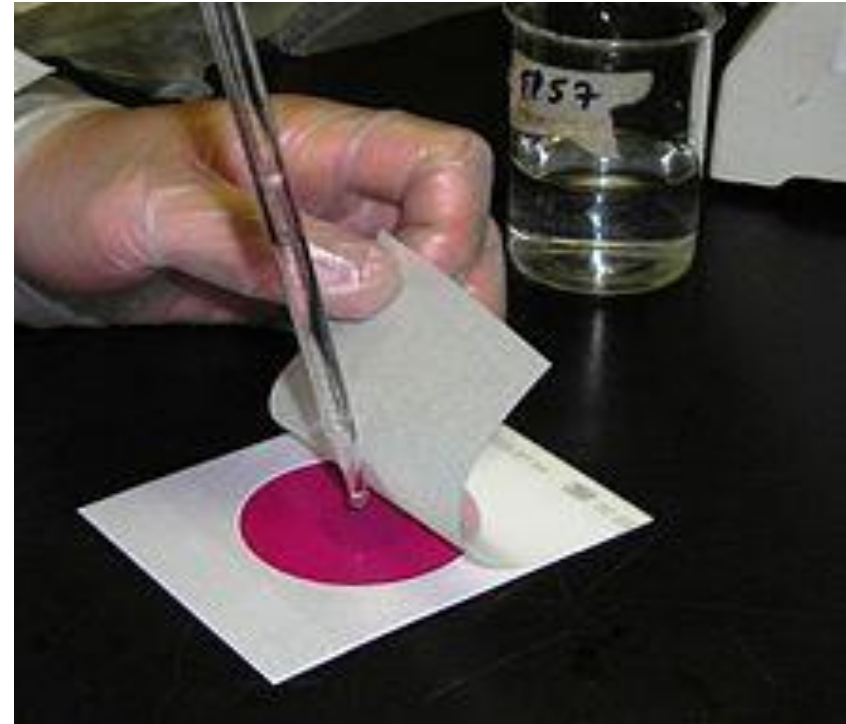
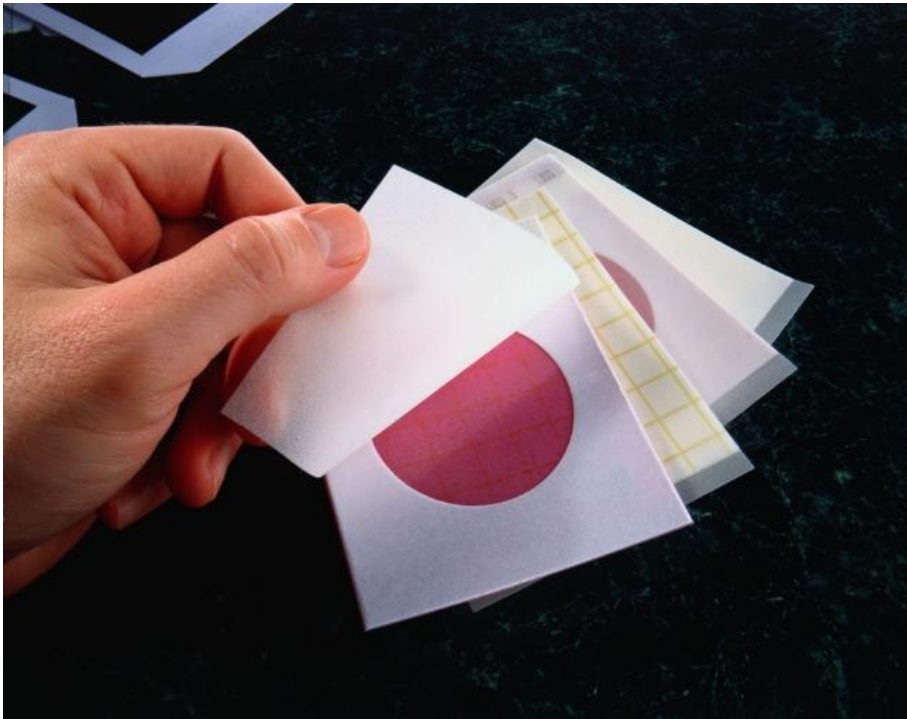


Απαρίθμηση με Petrifilm 1/5





Απαρίθμηση με Petrifilm 2/5

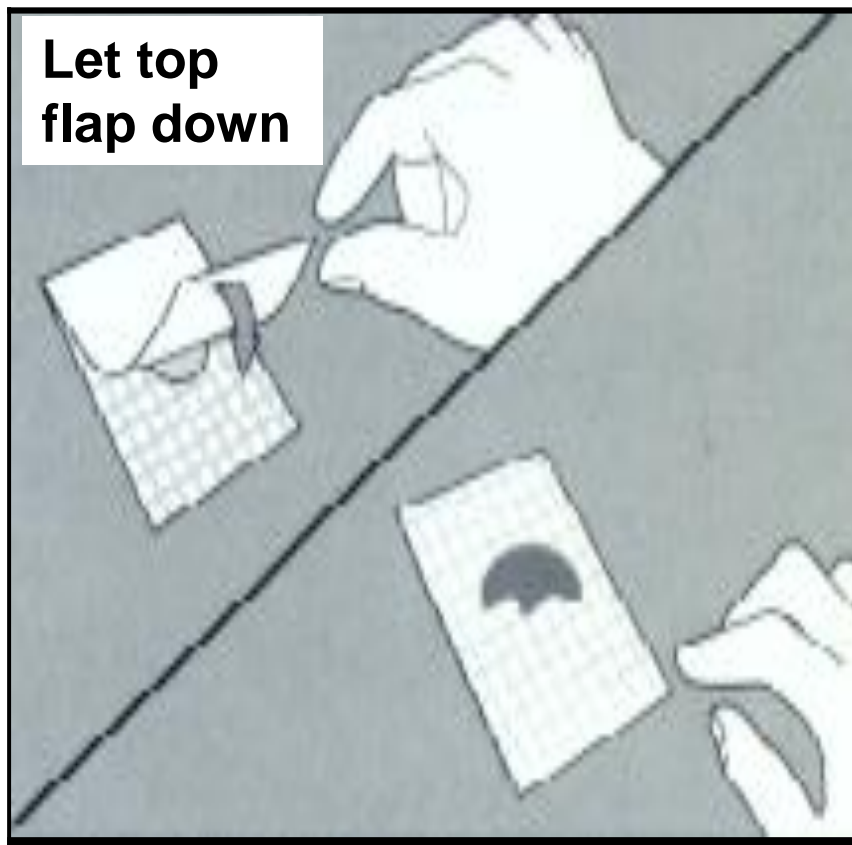




Απαρίθμηση με Petrifilm 3/5

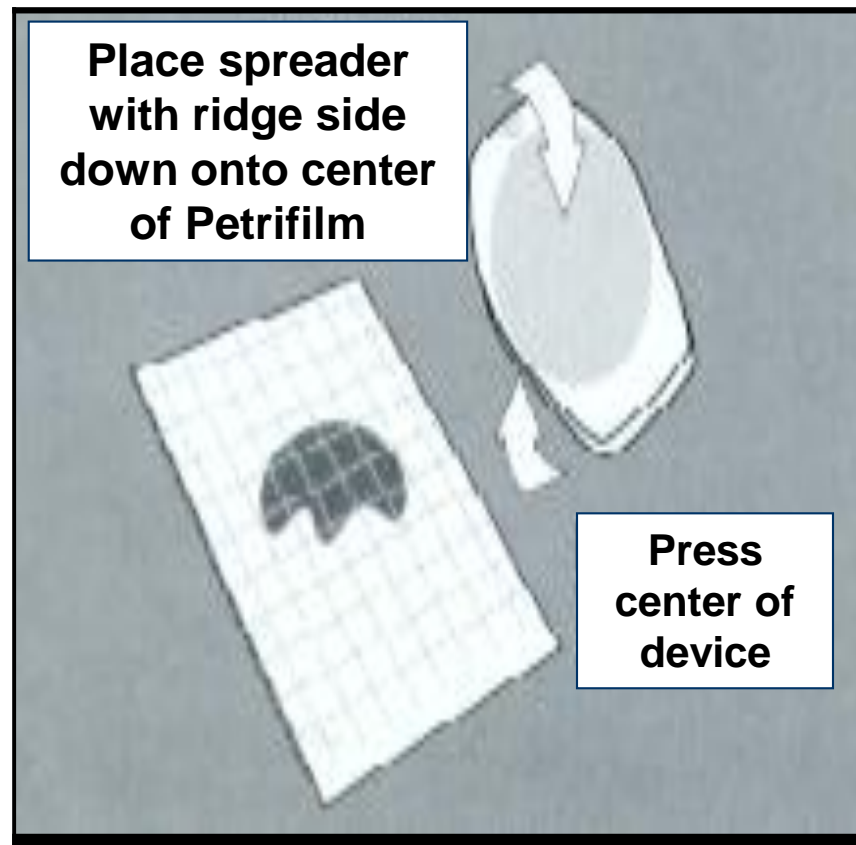
1

Let top flap down



2

Place spreader with ridge side down onto center of Petrifilm

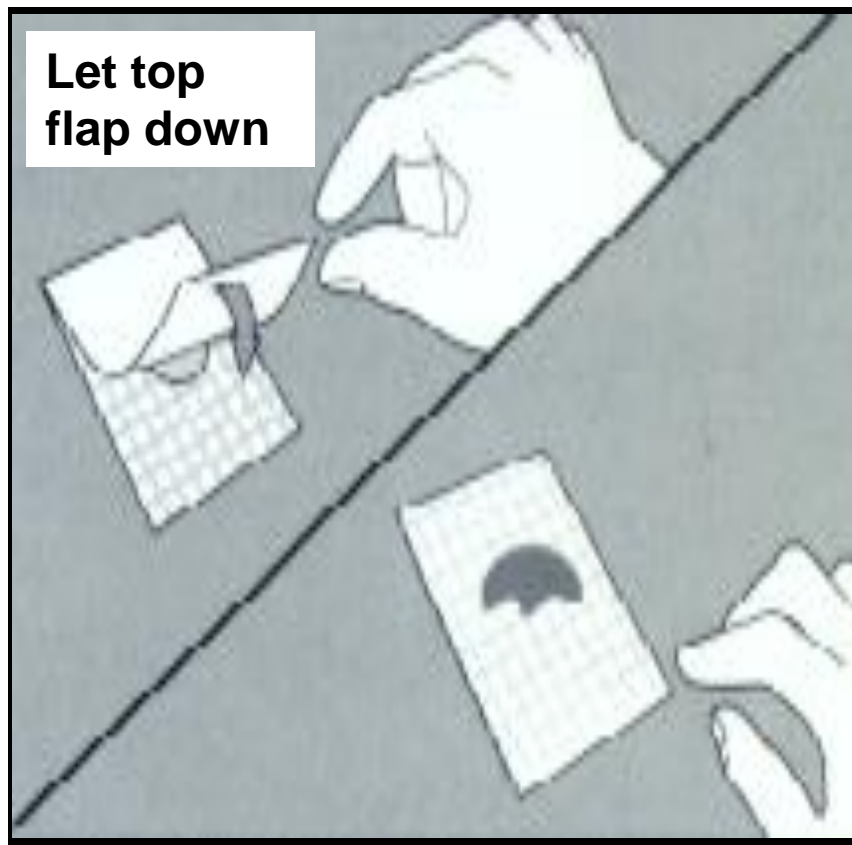


Press center of device

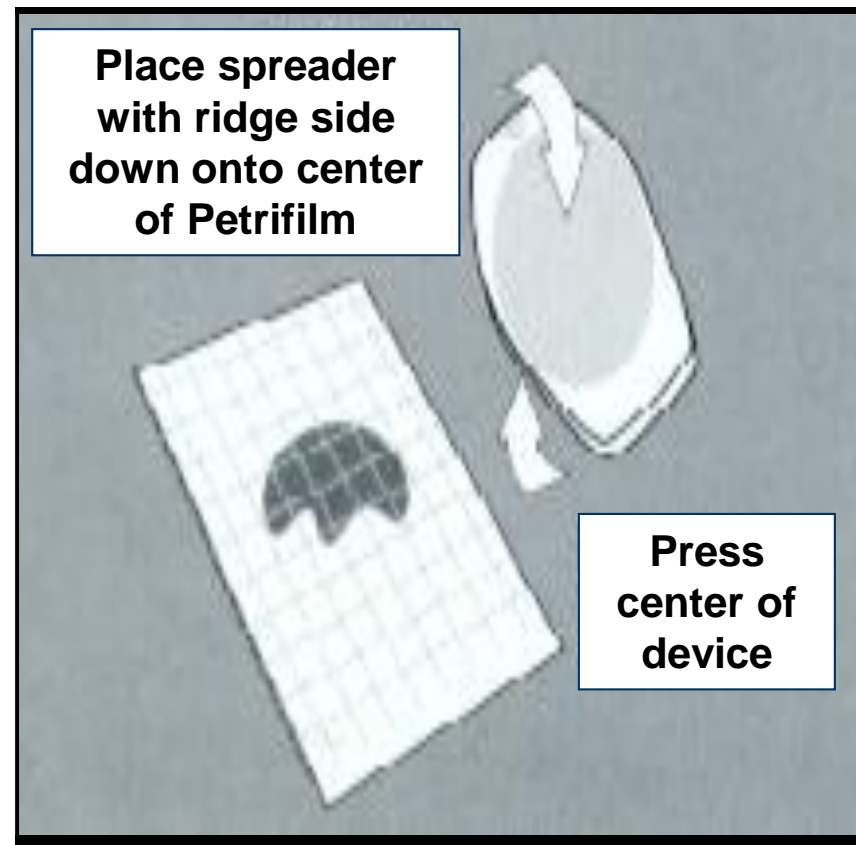


Απαρίθμηση με Petrifilm 4/5

3

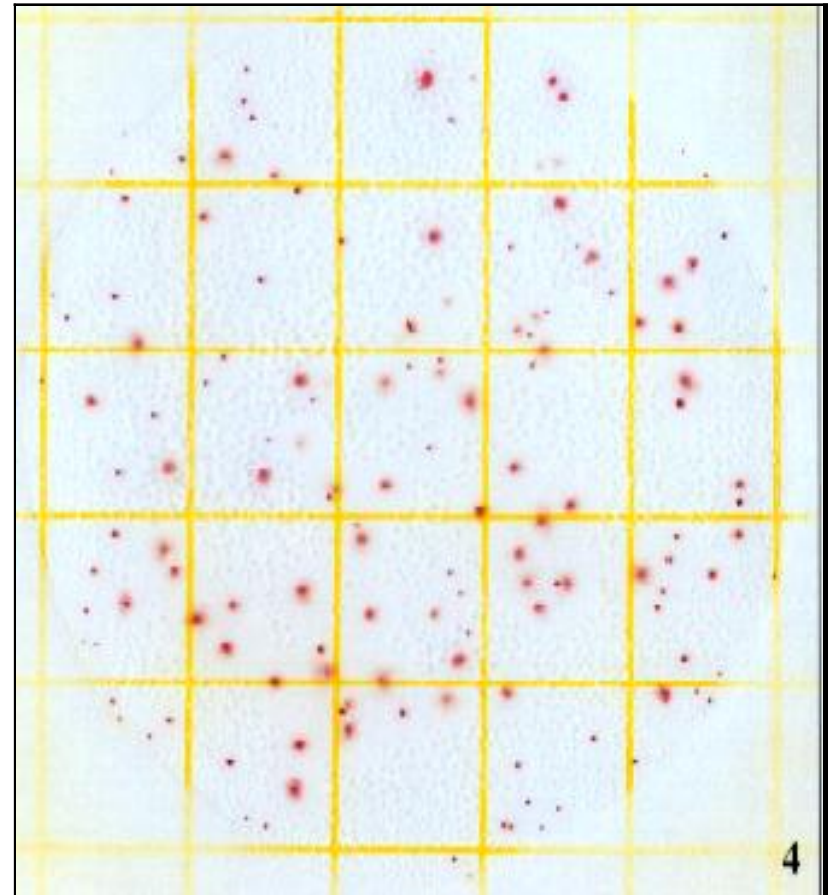


4





Απαρίθμηση με Petrifilm 5/5

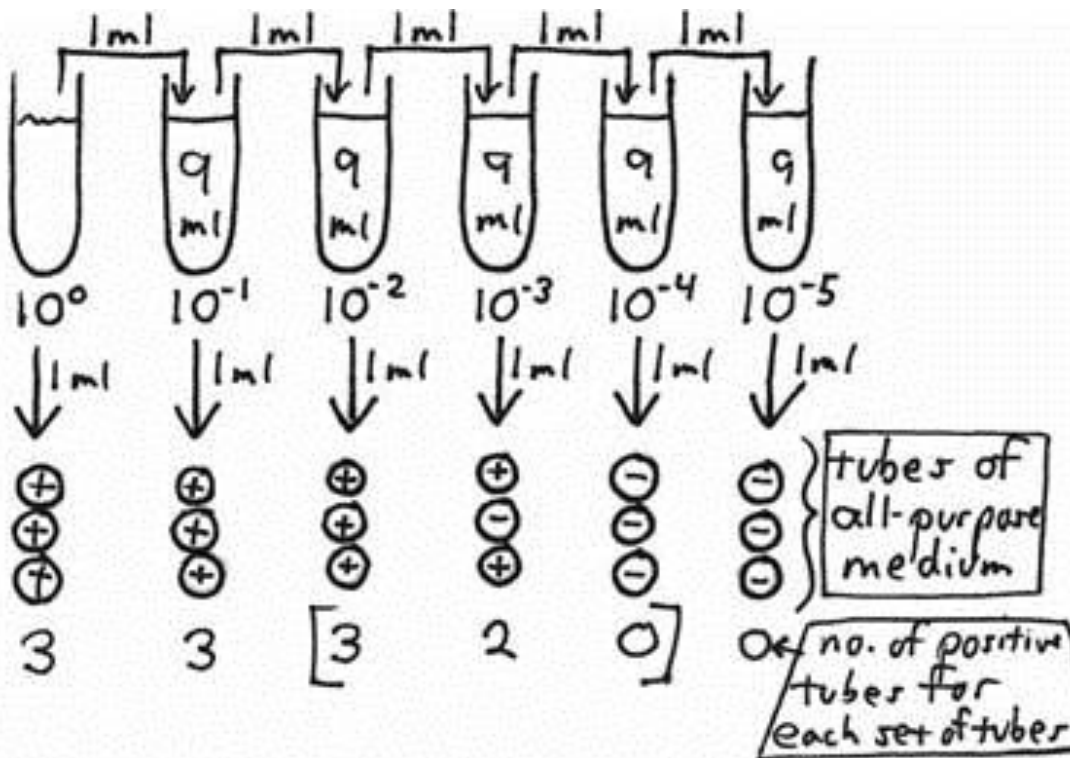


Αποτελέσματα ανάλυσης



Μέθοδος του περισσότερο πιθανού αριθμού 1/4

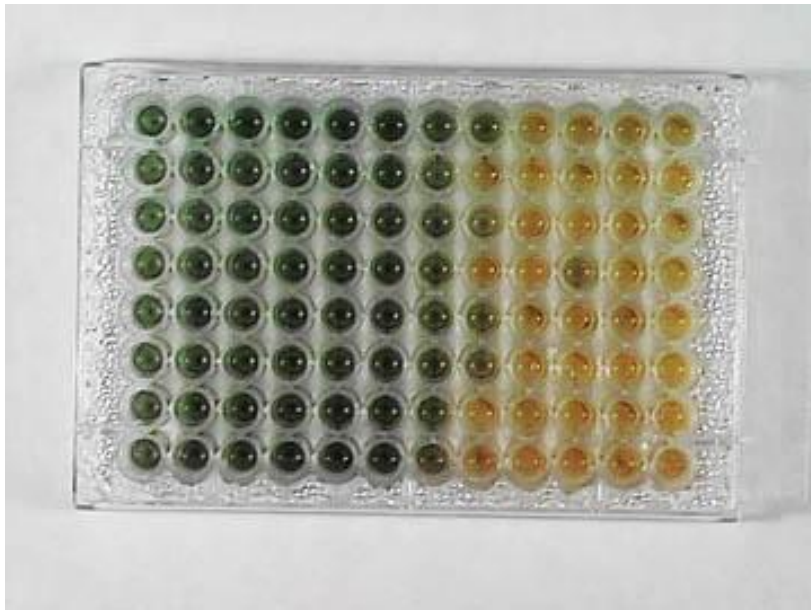
Most Probable Number (MPN)



- Χρησιμοποιείται κυρίως για την απαρίθμηση χαμηλών πληθυσμών σε υγρά τρόφιμα (π.χ. χυμοί, νερό, κλπ).



Μέθοδος του Περισσότερο Πιθανού Αριθμού 2/4





Μέθοδος του Περισσότερο Πιθανού Αριθμού 3/4

Most Probable Number (MPN)

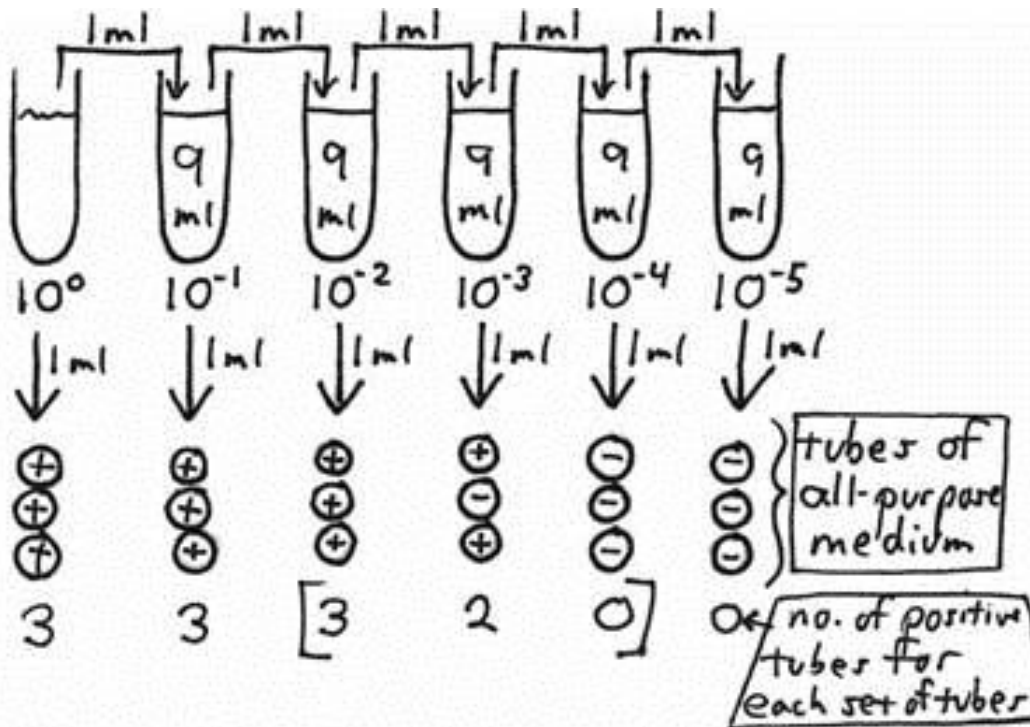
Table 1. MPN Index and 95% Confidence Limits for Various Combinations of Positive Tubes in a 3 Tube Dilution Series Using Inoculum Quantities of 10, 1 and 0.1 g (ml).

Combination of Positives	MPN Index per g (ml)	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
0-0-0	<0.03	---	0.095
0-0-1	0.030	0.0015	0.096
0-1-0	0.030	0.0015	0.11
0-1-1	0.061	0.012	0.18
0-2-0	0.062	0.012	0.18
0-3-0	0.094	0.036	0.38
1-0-0	0.036	0.0017	0.18
1-0-1	0.072	0.013	0.18
1-0-2	0.11	0.036	0.38
1-1-0	0.074	0.013	0.20
1-1-1	0.11	0.036	0.38
1-2-0	0.11	0.036	0.42
1-2-1	0.15	0.045	0.42
1-3-0	0.16	0.045	0.42
2-0-0	0.092	0.014	0.38
2-0-1	0.14	0.036	0.42
2-0-2	0.02	0.045	0.42
2-1-0	0.15	0.037	0.42
2-1-1	0.20	0.045	0.42
2-1-2	0.27	0.087	0.94
2-2-0	0.21	0.045	0.42
2-2-1	0.28	0.087	0.94
2-2-2	0.35	0.087	0.94
2-3-0	0.29	0.087	0.94
2-3-1	0.36	0.087	0.94
3-0-0	0.23	0.046	0.94
3-0-1	0.38	0.087	1.1
3-0-2	0.64	0.17	1.8
3-1-0	0.43	0.09	1.8
3-1-1	0.75	0.17	2.0
3-1-2	1.2	0.37	4.2
3-1-3	1.6	0.40	4.2
3-2-0	0.93	0.18	4.2
3-2-1	1.5	0.37	4.2
3-2-2	2.1	0.40	4.3
3-2-3	2.9	0.90	10.
3-3-0	2.4	0.42	10.
3-3-1	4.6	0.90	20.
3-3-2	11.	1.8	41.
3-3-3	>11.	4.2	---



Μέθοδος του Περισσότερο Πιθανού Αριθμού 4/4

Most Probable Number (MPN)



- Στο 3-2-0 αντιστοιχεί το 0.93 και σημαίνει ότι κατά μέσο όρο οι σωλήνες της ενδιάμεσης αραιώσης (10^{-3}) περιέχουν 0.93 μικροοργανισμούς.

- Συνεπώς ο πληθυσμός είναι:
 $0.93 \times 1 \text{ ml} \times 10^3 = 9.3 \times 10^2$



SPIRAL PLATE

- Με τη μέθοδο αυτή το όργανο διανέμει το υγρό εμβόλιο στην επιφάνεια ενός περιστρεφόμενου τρυβλίου. Η εναπόθεση αρχίζει από το κέντρο του τρυβλίου προς την περιφέρεια εναποθέτοντας σταδιακά όλο και λογότερο εμβόλιο.



Αποτέλεσμα

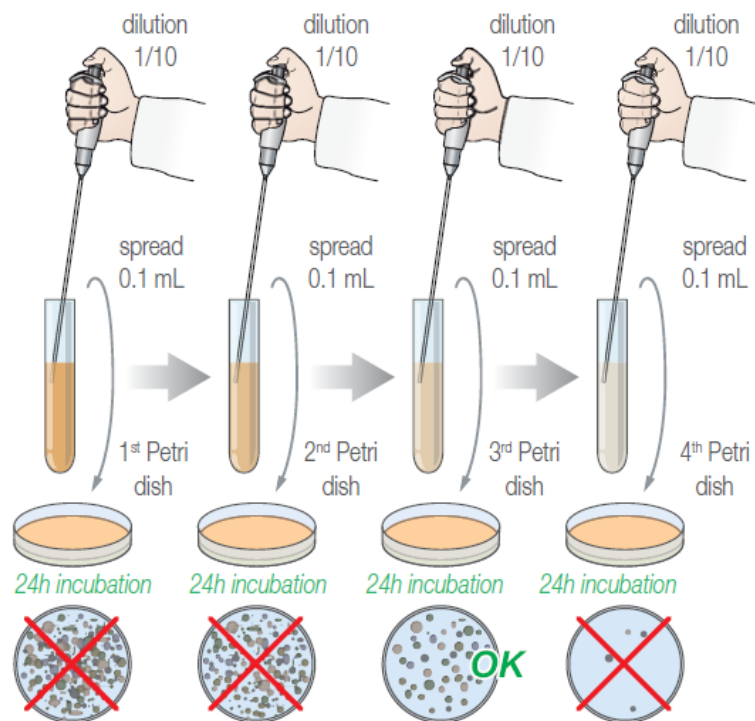


Σπειροειδής Μέθοδος Απαρίθμησης 1/3



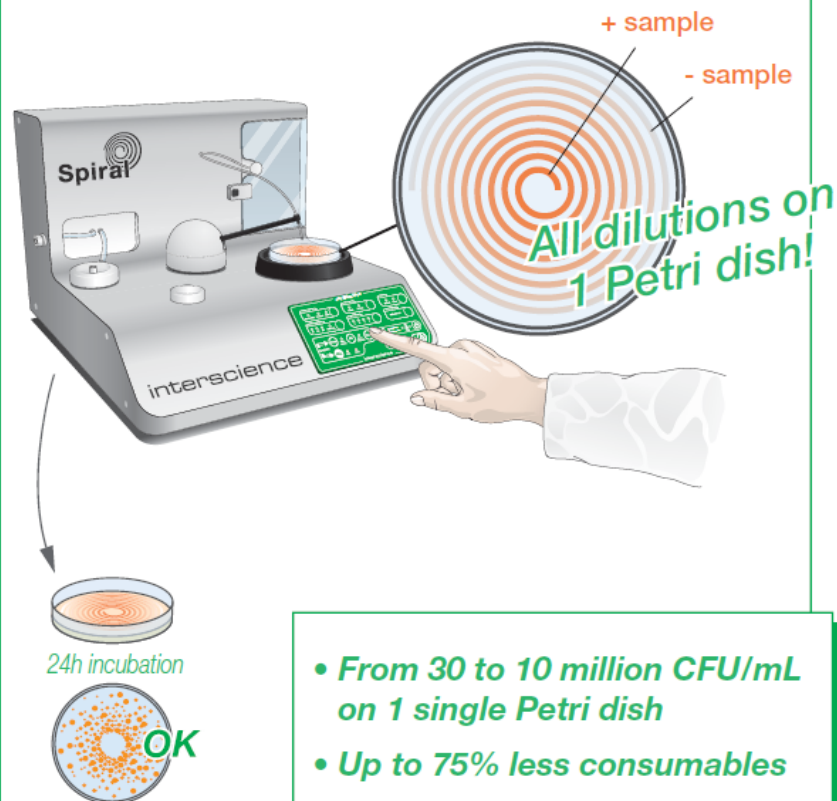
Manual plating method

This method requires repetitive actions: at least **four dilutions** and **four successive platings** are necessary to obtain one good and readable Petri dish.



Automatic Spiral[®] method

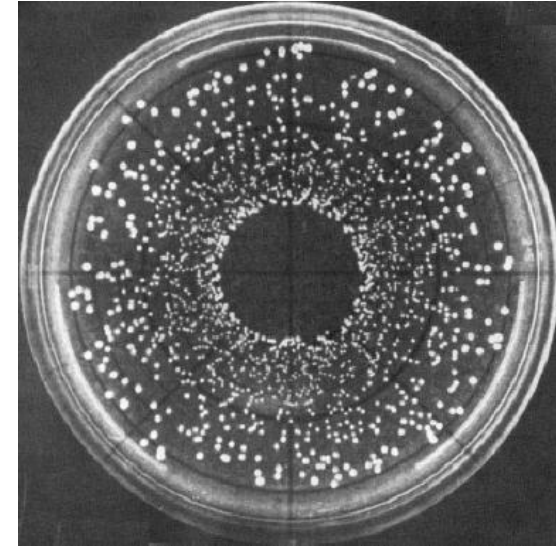
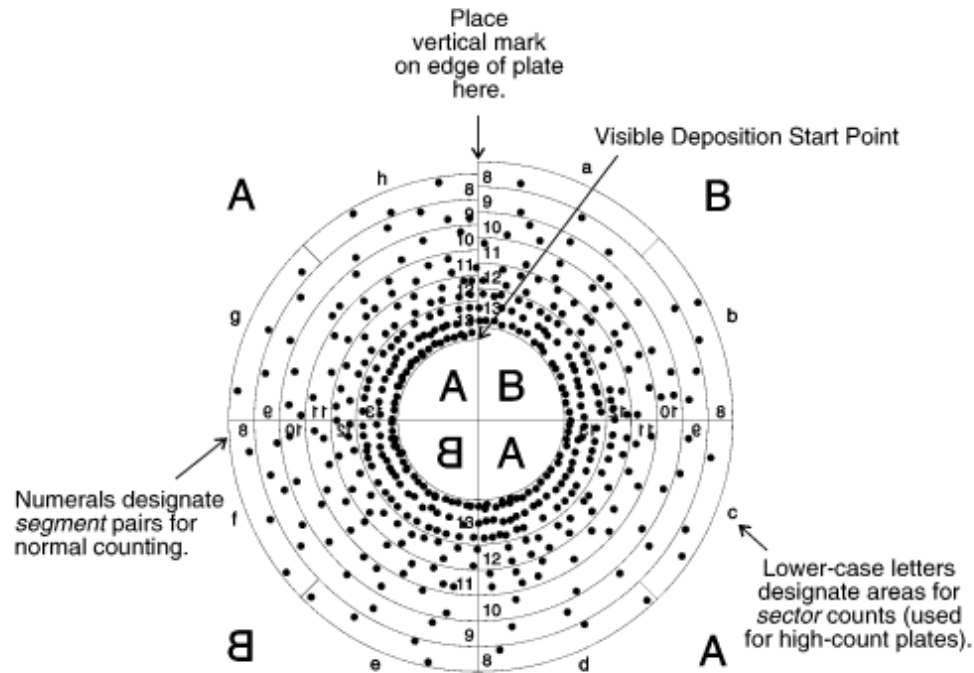
With this method, make your analyses on **1 single Petri dish!**



- From 30 to 10 million CFU/mL on 1 single Petri dish
- Up to 75% less consumables
- Full plating cycle in 25 seconds!

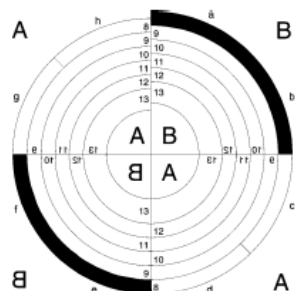


Σπειροειδής Μέθοδος Απαρίθμησης 2/3

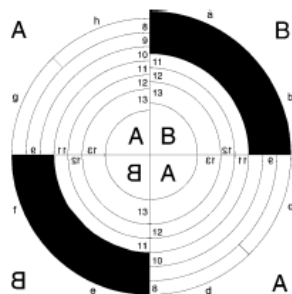




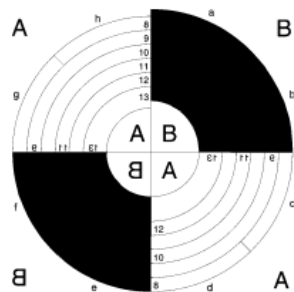
Σπειροειδής Μέθοδος Απαρίθμησης 3/3



Segment 8
Volume = 1.214 μL



Segment 10
Volume = 5.500 μL



Segment 13
Volume = 25.015 μL

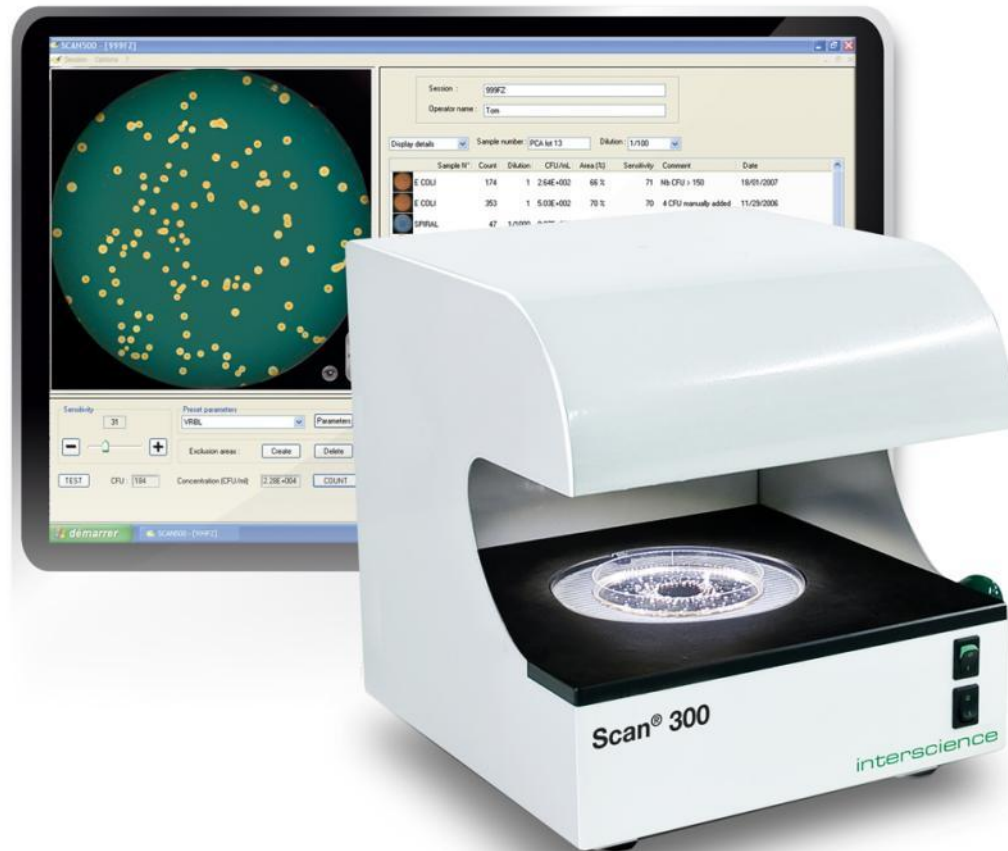
Segment Pair	50 μL Setting		100 μL Setting	
	100 mm Plate μL Deposited	150 mm Plate μL Deposited	100 mm Plate μL Deposited	150 mm Plate μL Deposited
1	-	0.043	-	.086
2	-	0.115	-	.230
3	-	0.234	-	.468
4	-	0.431	-	.862
5	-	0.757	-	1.514
6	-	1.295	-	2.590
7	-	2.136	-	4.272
8	1.214	3.350	2.428	6.700
9	2.968	5.103	5.936	10.206
10	5.500	7.636	11.000	15.272
11	9.157	11.292	18.314	22.584
12	14.482	16.618	28.964	33.236
13	25.015	27.150	50.030	54.300
PLATE	50.030	54.300	100.060	108.600

See Section 5.2.1 for instructions. Values are cumulative, i.e., "Segment Pair 10" for a 100 mm plate represents the volume deposited in segments 8, 9 and 10. Divide the sum of colonies from both sides by the volume given for the highest number segment counted. Multiply by 1000 for cfu/ml. Bold values are most commonly used (100 mm plate size and 50 μL setting).

Figure 5.3: Segment Pair Counting. Counted segments of a 100 mm plate are darkened; volume deposited in the darkened areas are noted beside each plate. Count the number of colonies in the two opposing segments (minimum of 40 total colonies), divide by the volume constant, then multiply by 1000 for cfu/ml (Table 5.1). Total volume plated is 50.03 μL .



Αυτόματος Καταμετρητής Αποικιών





Σπειροειδής Μέθοδος Απαρίθμησης

● Πλεονεκτήματα

- Χρησιμοποιείται λιγότερο άγαρ
- Χρησιμοποιούνται λιγότερα τριβλία
- Χρησιμοποιείται από μη ειδικευμένο προσωπικό
- Εξοικονόμηση χρόνου

● Μειονεκτήματα

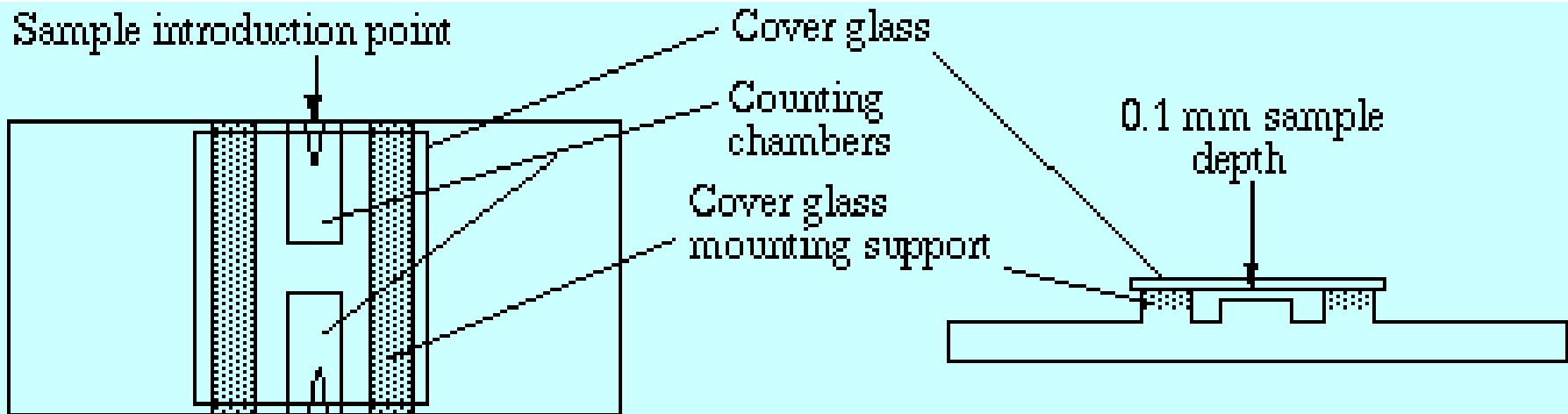
- Τα αιωρούμενα σωματίδια μπορεί να φράξουν το όργανο



- Είναι κατάλληλο για υγρά τρόφιμα
- Υψηλό αρχικό κόστος



Αιματοκυτομετρο (Counting Chamber) 1/7

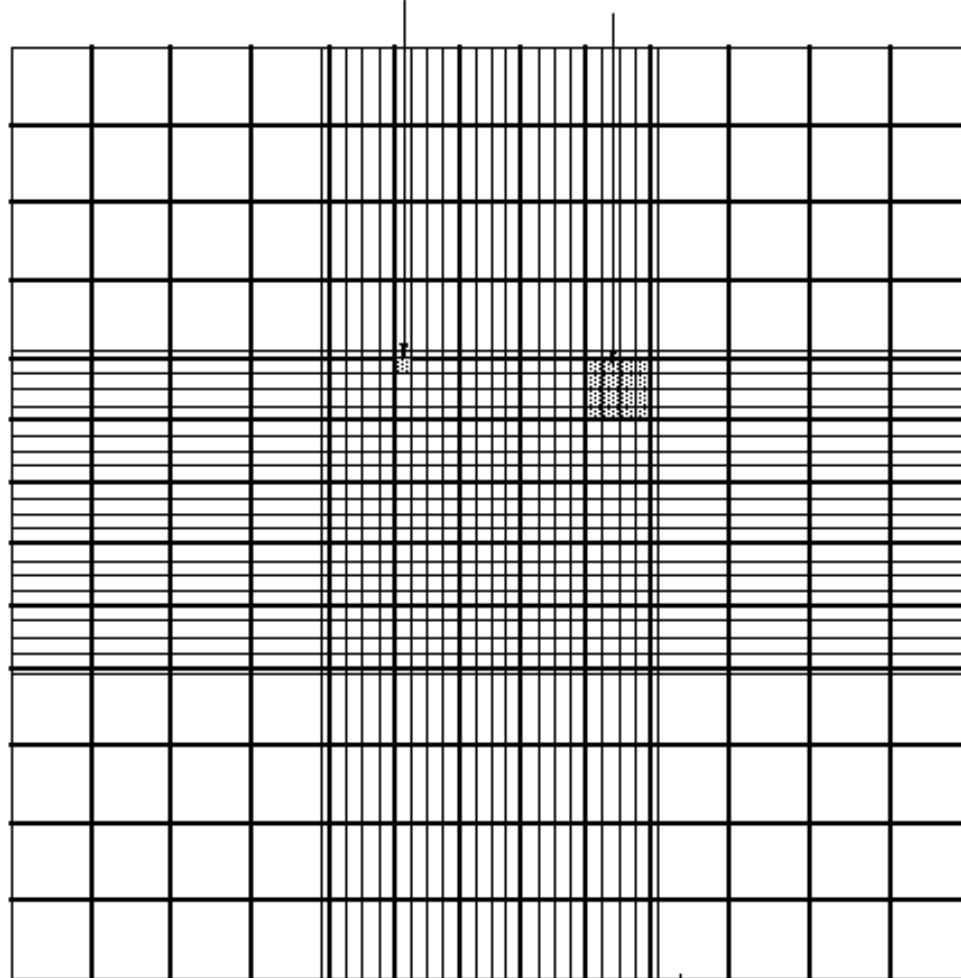




Αιματοκυτομετρο (Counting Chamber) 2/7

Small square = $1/400$ sq. mm.

$1/25$ sq. mm.



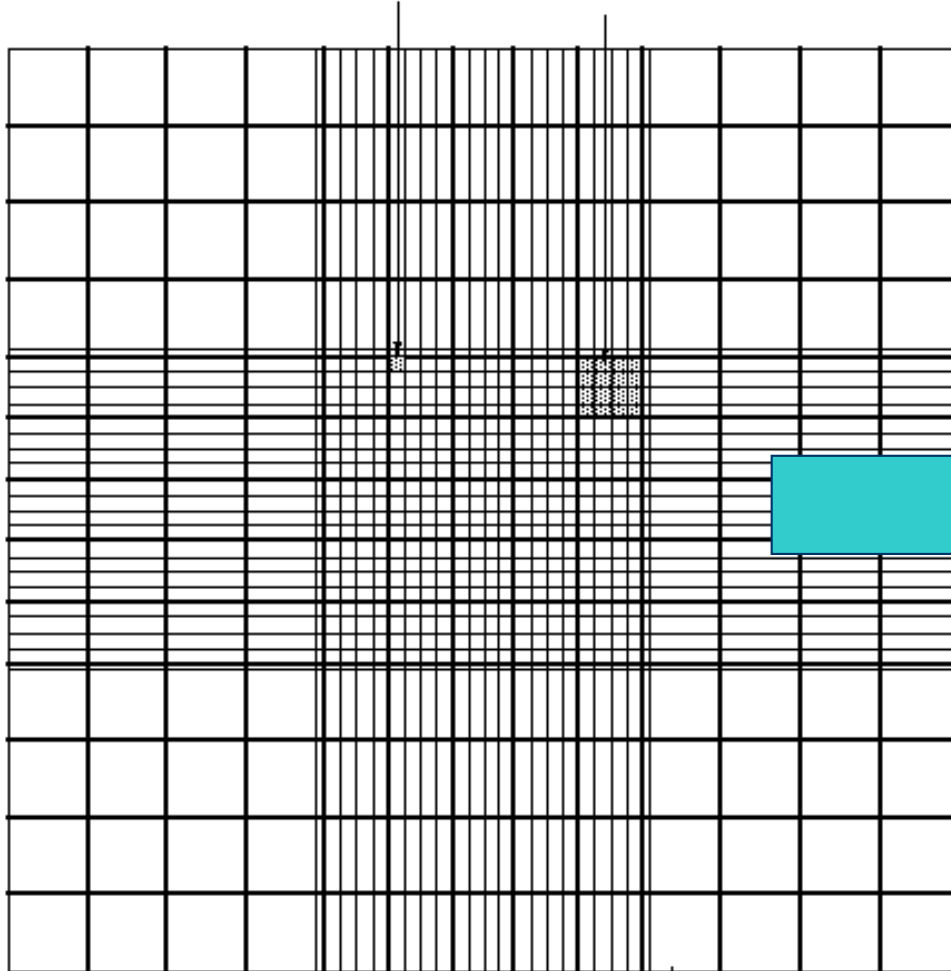
Counting grid (central area)



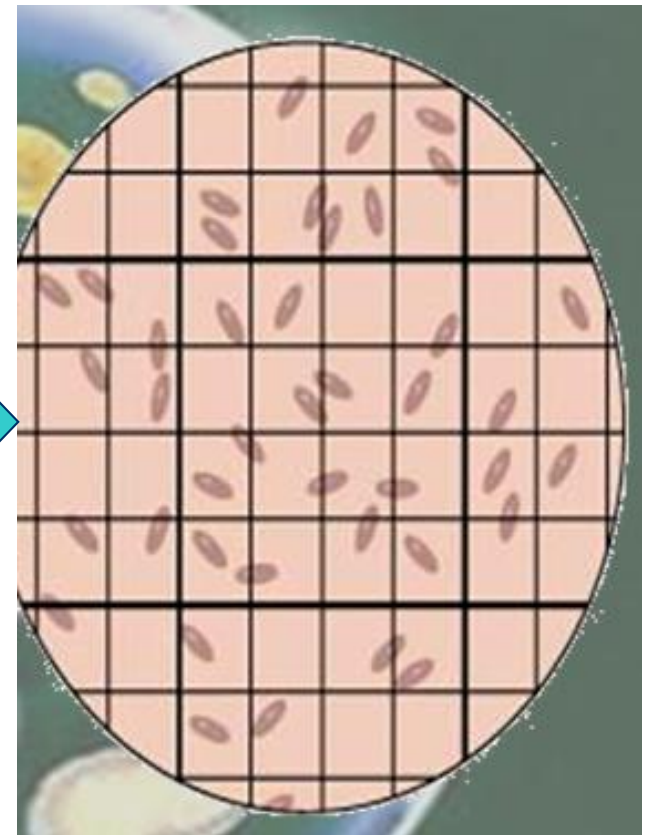
Αιματοκυτόμετρο (counting chamber) 3/7

Small square = $1/400$ sq. mm.

$1/25$ sq. mm.

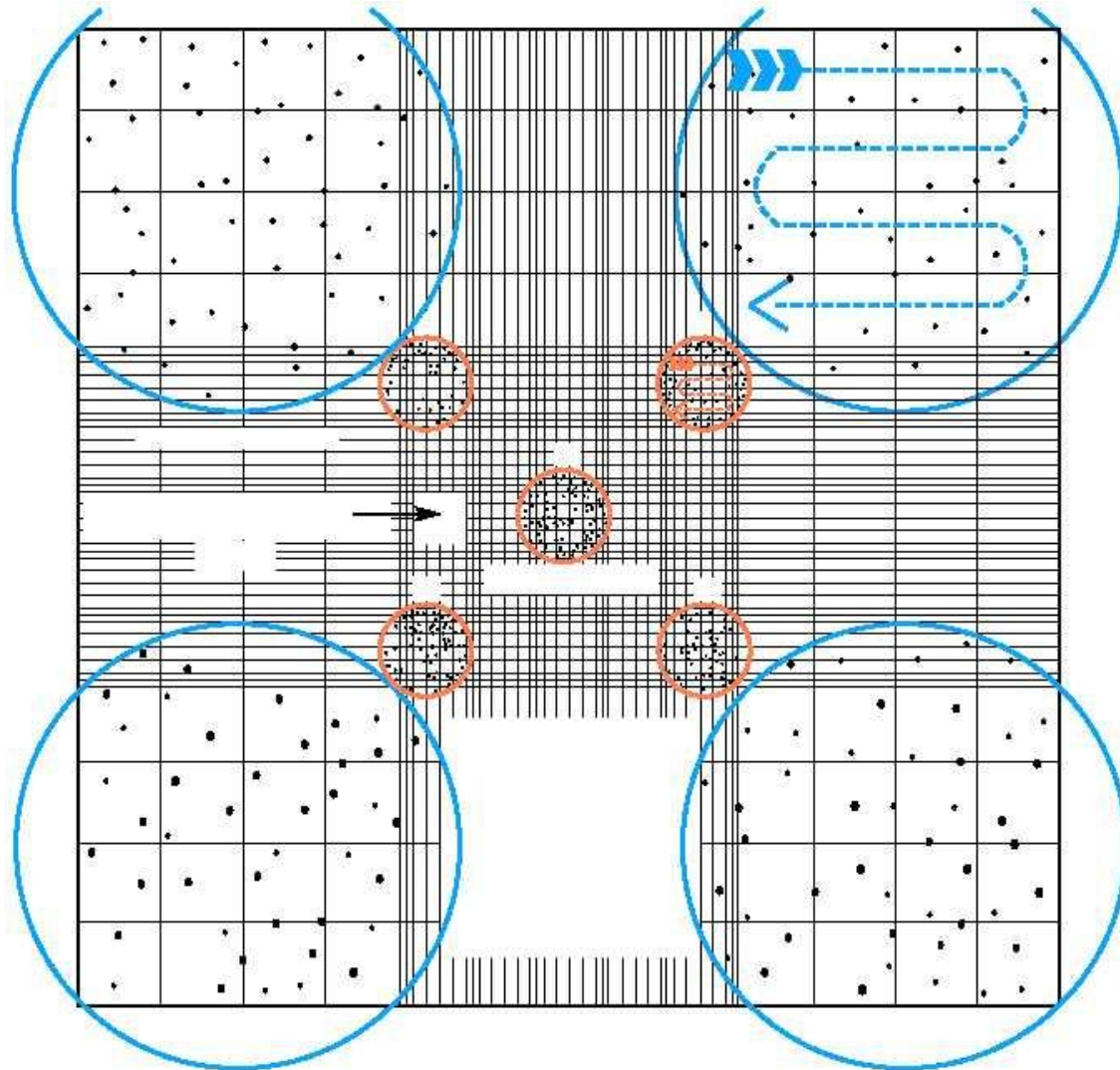


Counting grid (central area)





Αιματοκυτόμετρο (counting chamber) 4/7

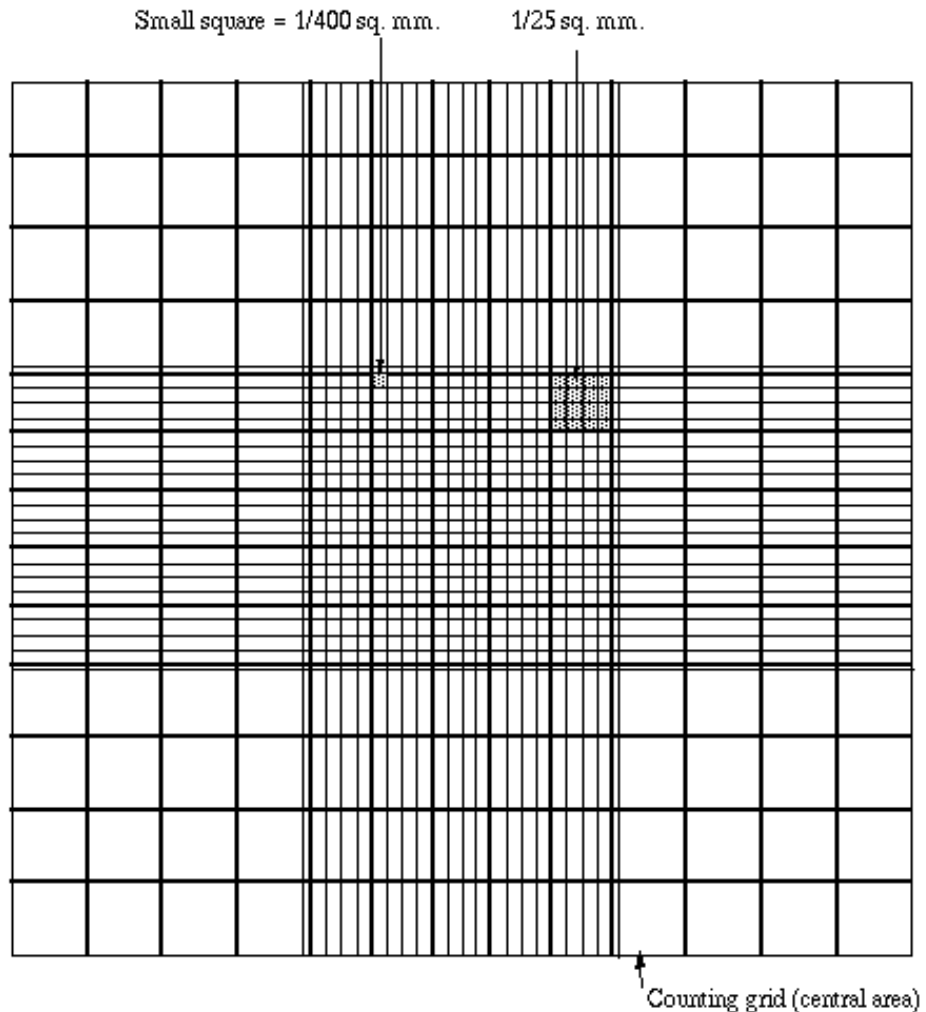




Αιματοκυτόμετρο (counting chamber) 5/7

Υπολογισμός:

1. Κάθε μικρό τετράγωνο έχει εμβαδόν: $1/25 \text{ mm}^2 = 0.04 \text{ mm}^2$
2. Το βάθος της αντικειμενοφόρου πλάκας είναι: 0.1 mm
3. Άρα, ο όγκος κάθε τετραγώνου είναι: 0.004 mm^3





Αιματοκυτόμετρο (counting chamber) 6/7

Υπολογισμός:

4. Επειδή πάντα μετρώ σε 5 τετράγωνα για να έχω αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα, ο συνολικός όγκος είναι: $5 \times 0.004 \text{ mm}^3 = 0.02 \text{ mm}^3$
5. Εάν στα 5 αυτά τετράγωνα έχω μετρήσεις π.χ. 187 κύτταρα, τότε στη μονάδα του όγκου (1 mm^3) έχω:
6. $187/0.02 = 9350$ κύτταρα/ mm^3
7. Τελικά έχω 9.350.000 κύτταρα/ml



Αιματοκυτόμετρο (counting chamber) 7/7

Πλεονεκτήματα:

1. Μέθοδος εύκολη και γρήγορη
2. Μπορεί να μελετηθεί η μορφολογία των κυττάρων
3. Η χρήση χρωστικών φθορισμού μπορεί να βελτιώσει την παρατήρηση

Μειονεκτήματα:

1. Μέτρηση όλων των κυττάρων
2. Αιωρούμενα στερεά από το τρόφιμο δυσκολεύουν την μέτρηση

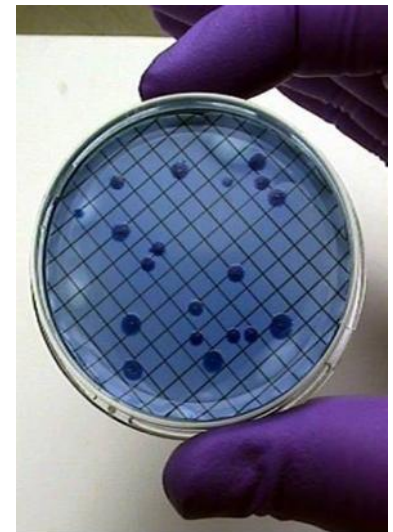
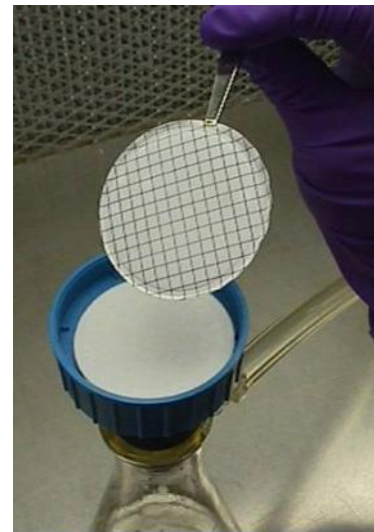
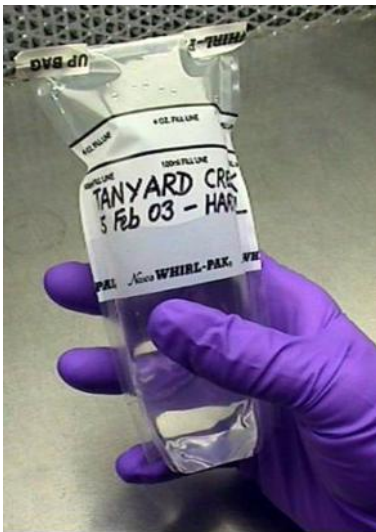
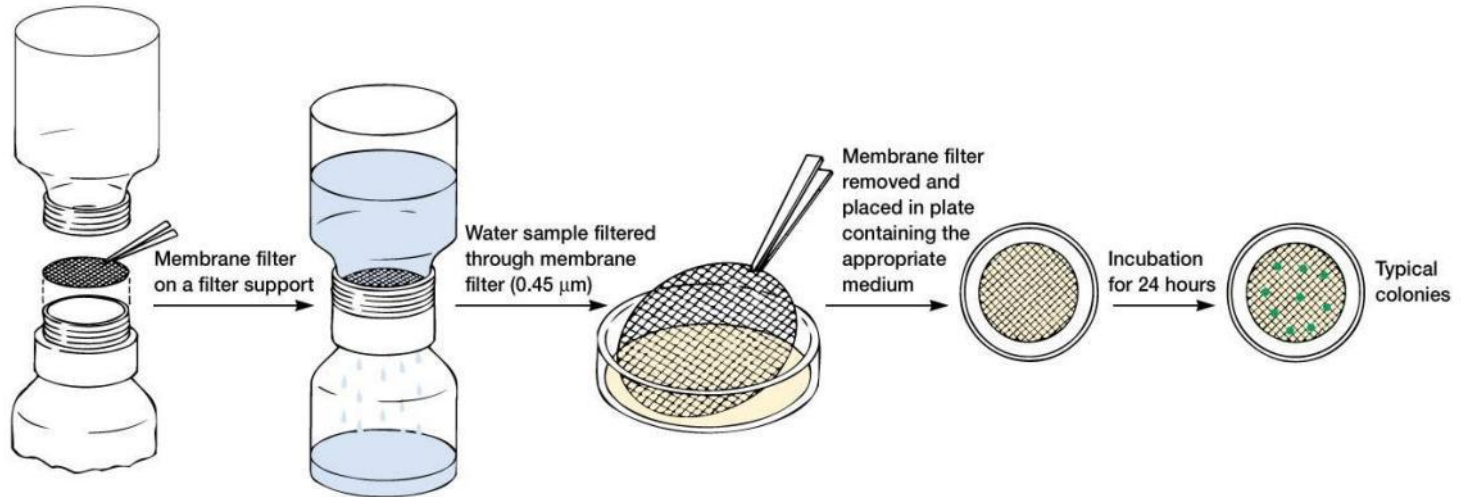


Χρήση φίλτρων διήθησης (membrane filters)

- Μεμβράνες με πόρους μικρής διαμέτρου κρατούν τα κύτταρα (π.χ. 0.45 μm).
- Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετείται σε τριβλίο με άγαρ.
- Ακολουθεί επώαση και απαρίθμηση των μικροοργανισμών.
- Κατάλληλη μέθοδος για μικρό αριθμό κυττάρων.

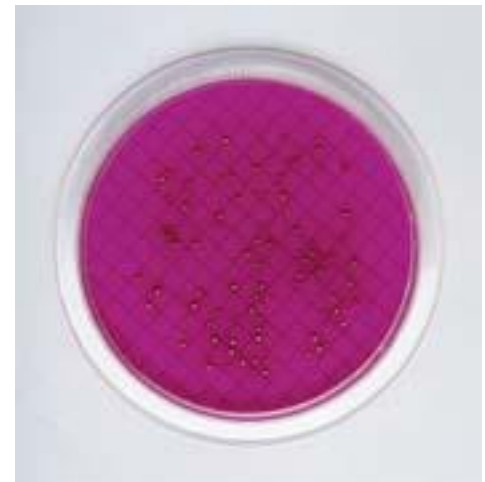


Τεχνική Διήθησης Υγρών Δειγμάτων 1/3



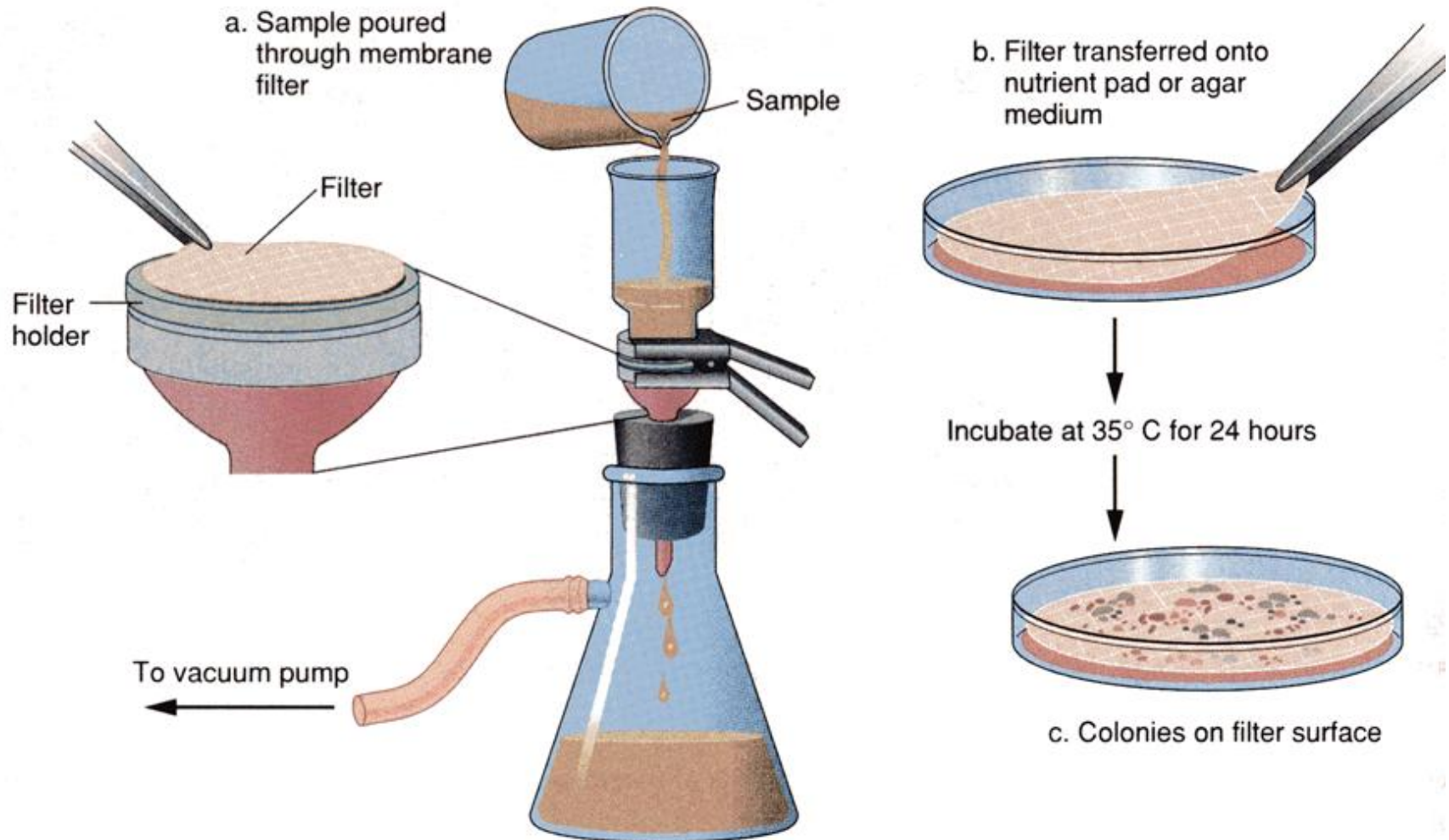


Τεχνική Διήθησης Υγρών Δειγμάτων 2/3





Τεχνική Διήθησης Υγρών Δειγμάτων 3/3





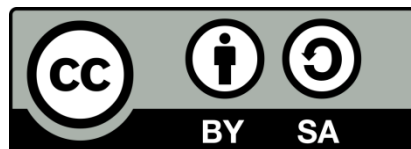
Βιβλιογραφία

- Νυχάς, Γ.Ι. Σημειώσεις στη Μικροβιολογία Τροφίμων. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Martin R. Adams and Maurice O. Moss (2008) Food Microbiology, 3rd Edition, RSC Publishing, London, UK.
- Jay, J.M. (2000) Modern Food Microbiology, 6th Edition, Aspen Publishers, Maryland, USA.



Άδειες Χρήσης

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons.
- Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδεια χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.





Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στο πλαίσιο του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο την αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



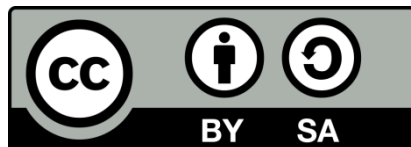
Σημείωμα Αναφοράς

- Copyright Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών 2015. Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Ευστάθιος Πανάγου/ Πασχαλίτσα Τρυφινόπουλου/ Αναστάσιος Σταματίου, «Μικροβιολογία Τροφίμων Ι Εργαστήριο». Έκδοση: 1.0. Αθήνα 2015. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: <https://mediasrv.aua.gr/eclass/>



Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά, Παρόμοια Διανομή 4.0 [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων, π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



Η άδεια αυτή ανήκει στις άδειες που ακολουθούν τις προδιαγραφές του Ορισμού Ανοικτής Γνώσης [2], είναι ανοικτό πολιτιστικό έργο [3] και για το λόγο αυτό αποτελεί ανοικτό περιεχόμενο [4].

[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

[2] <http://opendefinition.org/okd/ellinika/>

[3] <http://freedomdefined.org/Definition/EI>

[4] <http://opendefinition.org/buttons/>



Διατήρηση Σημειωμάτων

Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:

- το Σημείωμα Αναφοράς
- το Σημείωμα Αδειοδότησης
- τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων
- το Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (εφόσον υπάρχει) μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.